DOI:10.11931/guihaia.gxzw201906027

龙眼 *DlPSY* 基因在根和叶中的表达及其生物信息学分析

郑威[1*]，孙文文[1]，董学明[1]，张秋颖[1]，于雪飞[2]，陈宁[1]

（1. 哈尔滨商业大学 药学院，哈尔滨 150076； 2. 哈尔滨商业大学图书馆，哈尔滨 150028）

摘要：为研究八氢番茄红素合成酶（Phytoene Synthase）基因在龙眼类胡萝卜素合成途径中的作用机制，我们从龙眼转录组数据中筛选获得一个 *PSY* 基因，命名为 *DlPSY*，采用生物信息学方法对龙眼 PSY 蛋白的一级结构、理化性质、信号肽、跨膜结构、亚细胞定位、亲疏水性、蛋白质二级结构、蛋白质三级结构、卷曲螺旋域、蛋白质结合位点、系统进化树、蛋白质互作等进行分析和预测；同时运用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术对 *DlPSY* 基因在龙眼根和叶中的差异表达进行分析。实验结果表明：龙眼 *DlPSY* 基因长度为 1260 bp，编码 420 个氨基酸；生物信息学预测 DlPSY 蛋白具有 Isoprenoid Biosyn C1 超家族结构，含有信号肽，为分泌性蛋白，无跨膜结构，是一种可溶性亲水蛋白，定位于膜外；DlPSY 蛋白的二级结构主要由α-螺旋和无规则卷曲组成，具有卷曲螺旋。Ramachandran 评估结果表明应用 SWISS-MODEL 构建的蛋白质三级结构模型可靠，其配体结合位点为 344Phe 和 347Lys。qRT-PCR 分析结果表明 *DlPSY* 基因在龙眼根和叶中均有表达，叶中表达量高于其在根中的表达量。该研究的结果为下一步采用遗传学方法提高龙眼中类胡萝卜素的含量奠定理论基础。

关键词：龙眼，*PSY* 基因，生物信息学，基因表达

中图分类号：　　　　文献标志码：A　　　　文章编号：

Expression of *DlPSY* Gene in roots and leaves of *Dimocarpus longan* Lour and its Bioinformatics Analysis

ZHENG Wei[1*]，SUN Wen-wen[1]，DONG Xue-ming[1]，ZHANG Qiu-ying[1]，YU Xue-fei[2]，CHEN Ning[1]

（*1. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce*, Harbin 150076; 2. *Library, Harbin University of Commerce*, Harbin 150028）

Abstract: To study the function of phytoene synthase gene in carotenoid synthesis of *D. longan*, a

基金项目：黑龙江省自然基金(H2017001)；黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT-2017210)；哈尔滨商业大学青年科研项目(17XN007)；哈尔滨商业大学博士启动基(14LG06)(2016BS24)；哈尔滨商业大学研究生创新项目(YJSCX2018-545HSD) [Supported by Heilongjiang Natural Science Fund (H2017001); University Nursing Program for Young Scholars with Creative Talents in Heilongjiang Province (UNPYSCT-2017210); Scientific Research Projects at Harbin University of Commerce (17XN007); Doctoral Science Foundation of Harbin University of Commerce (14LG06)(2016BS24); Graduate Student Innovation Research Project at Harbin University of Commerce (YJSCX2018-545HSD)]。

作者简介：郑威（1983-），男，黑龙江哈尔滨人，博士研究生，研究方向为药用植物次生代谢产物合成，（Email）wei2013zheng@163.com。

*通信作者：

DlPSY gene identified from *D. longan* RNA-seq data was screened and analyzed in this research by bioinformatics methods including the primary structure of protein, physicochemical properties, signal peptide, transmembrane region, subcellular localization, hydrophilicity, protein secondary structure and tertiary structure, coiled coil domain, protein binding site, phylogenetic tree, as well as protein-protein interaction. In addition, the real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was applied in this research to analyze the expression pattern of *DlPSY* gene in root and leaf tissues. The bioinformatics software used in this research included NCBI BLAST, DNAMAN, NCBI CD search, Protparam, SignalP4.1Server, TMHMM Server, SOSUI, PSORT, ProtScale, SOPMA, COILS, SWISS-MODEL, MolProbity, 3DLigandSite, and STRING. The bioinformatics analysis results showed that the length of the *DlPSY* gene was 1260 bp, coding for 420 amino acids; the DlPSY protein was predicted to have 'Isoprenoid Biosyn C1' superfamily structure; it contained a signal peptide; the DlPSY protein did not contain the transmembrane structure; it was a soluble hydrophilic and secretory protein which was predicted to be located outside the membrane; the DlPSY protein secondary structure was predicted to be mainly composed of α-helix and random coil; the DlPSY protein was predicted to have a coiled helix; the Ramachandran evaluation results showed that the tertiary structure model constructed by SWISS-MODEL was reliable, and its ligand binding sites were 344Phe and 347Lys, respectively. In addition, the expression pattern of the *DlPSY* gene was analyzed by qRT-PCR, the results of which showed that the *DlPSY* gene was expressed in roots and leaves of *D.longan* but with the different expression levels. The expression level of *DlPSY* gene was higher in leaf tissue than that in root tissue. The results of this study will enrich our knowledge on *PSY* gene family and also lay a foundation for further improving the carotenoid content in *D. longan* by genetic methods.

Keywords: *Dimocarpus longan* Lour., *DlPSY*, bioinformatics, gene expression

龙眼（*Dimocarpus longan* Lour.），又名桂圆、益智，味甘、淡，性平，属于无患子科常青果树，具有清热解毒之功效（黄春燕等，2019）。龙眼原产于我国南方，是主要的栽培水果之一，但在泰国、印度和越南等地也有广泛的种植（Jiang et al., 2002；Campbell & Campbell，2001）。龙眼中含有丰富的膳食纤维、维生素、蛋白质、多糖和矿物质等（Chaikham & Prangthip，2015），对人体的健康十分有益，可以清除自由基，降低血糖，调节免疫系统、神经系统和内分泌系统等（Li et al.，2015；Jiang et al.，2014）。龙眼中也含有多种次生代谢产物，如酚酸、类黄酮和类胡萝卜素等，具有抗氧化、抗血清酶，抗突变、抗炎和抗癌等功效（Prasad et al.，2010；Rangkadilok et al.，2007）。

类胡萝卜素是高等植物中的一类重要的次生代谢产物，属烯萜类化合物，分子式为$C_{40}H_{56}$，分为胡萝卜素和叶黄素两大类。类胡萝卜素主要存在于植物的叶绿体和色素体膜上，参与光合作用并保护组织不受光氧化损伤等重要功能（Robert et al.，2004；Sanae et al.，2018）。在高等植物中，类胡萝卜素可以使组织和器官等（如花和果实）呈现出鲜艳的颜色，如黄色、橙色和红色等，使植物可以吸引传粉者（Tian et al.，2018；Suzuki et al.，2007）。除此之外，类胡萝卜素还具有多种生物活性，如抗氧化，提高人体免疫力，对心血管疾病、某些肿瘤具有一定的预防和治疗作用（王庆伟，2000）。类胡萝卜素是由八个异戊二烯单位缩合而成的类异戊二烯化合物（Li et al.，1996）。迄今为止，已经报道了约有 750 种天然类胡萝卜素，它们在光捕获、光保护和信号传导等方面发挥重要的作用（Nisar et al.，2015；Gruszecki & Strzałka，2005）。萜类化合物的生物合成途径有甲基赤藓糖-4-磷酸（MEP）途径和甲羟戊酸（MVA）途径。在光照条件下，类胡萝卜素的合成途径以 MEP 为主（霍培等，2011）。该途径在很多植物中予以详细阐述（图 1），其中类胡萝卜素合成的第一步是由八氢番茄红素合成酶（PSY）催化生成八氢番茄红素。PSY 是类胡萝卜素生物合成途径中第一个关键酶，

起限速作用（Zhang & Dubcovsky，2011）。大量研究表明 *PSY* 基因的表达水平影响植物中类胡萝卜素的积累（Shewmaker et al.，1999；Fray et al.，1995）。

龙眼在我国的种植面积广，资源丰富，其根、叶、花和种子等因含有类黄酮、萜类、多糖、酚酸等多种药用成分可作为药材使用，在我国已经有一百多年的应用历史(Thitiratsaku & Anprung，2014)。然而龙眼各组织中的药用成分含量较少，限制了龙眼作为中药材的应用范围及药用价值。本文对龙眼类胡萝卜素合成途径中关键的合成酶 PSY 蛋白进行全面的生物信息学分析，并运用 qRT-PCR 技术对该基因在龙眼根与叶中的表达进行研究，实验结果将丰富我们对植物 PSY 家族的认识，同时为今后采用遗传学手段提高龙眼类胡萝卜素的含量提供思路。

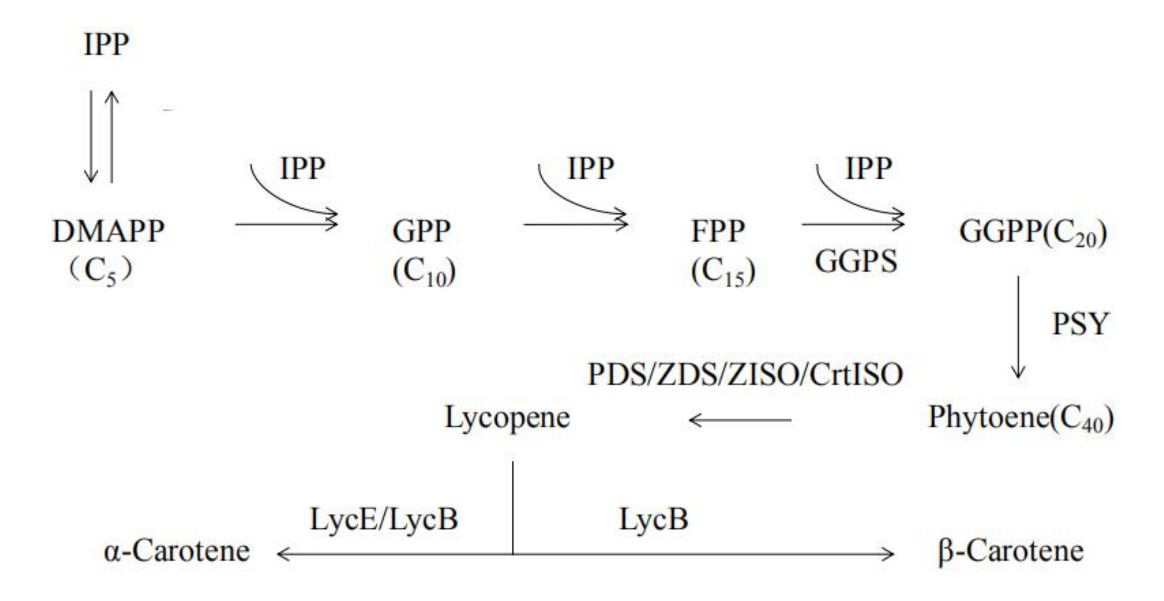


图 1　类胡萝卜素的生物合成途径（陈祥慧等，2018）

Fig.1　Schematic diagram of the biosynthetic pathway of carotenoids (Chen et al., 2018)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

将龙眼种子置于流水中冲洗 48h 后播种于哈尔滨商业大学药学院植物培养室的塑胶花盆（40cm×30cm×10cm）中，在恒温 25℃、湿度 50%条件下培养一个月后，选择长势一致且发育良好的龙眼植株；先用清水冲洗龙眼植株的根系除去泥土，快速用吸水纸吸取根上水分，用 RNAase-free 小剪刀剪取龙眼根尖和幼叶，用锡纸包裹，迅速放入液氮中速冻后置于-80℃超低温冰箱中保存备用。

1.1.2 实验仪器与试剂

主要仪器：T100^{TM} Themal Cycler 型 PCR 仪（Bio-Rad，CA，USA），CT15RE 型高速低温离心机（HITACHI， Japan），Gel DocTM XR^{+}型凝胶成像系统（Bio-Rad， CA,，USA），Bio-Rad CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪（Bio-Rad，CA，USA）。

主要试剂：2×TransTaq High Fidelity (HiFi) PCR SuperMix II (Transgen，Beijing，China)，TransStart Top Green qPCR SuperMix(TransGen， Beijing， China)， HiScript® II Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(Vazyme，Nanjing，China)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

运用 BLAST（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）和 DNAMAN 进行序列检索比对；运用 CD search（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）预测保守结构域；运用 Protparam（http://www.expasy.org/tools/protparam.html）分析蛋白理化性质；运用 SignalP4.1Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP）预测信号肽；运用 TMHMM Server v.2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）预测跨膜区；运用 SOSUI（http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html）进行可溶性蛋白预测；运用 PSORT（http://psort.hgc.jp）分析亚细胞定位；运用 ProtScale（http://ca.expasy.org/tools/protscale.html）分析亲疏水性；运用 SOPMA（https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html）进行二级结构预测；运用 COILS（http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html）进行卷曲螺旋分析；运用 SWISS-MODEL（https://www.swissmodel.expasy.org/）三级结构建模；运用 MolProbity（http://molprobity.biochem.duke.edu）进行拉氏构象图分析；运用 3DLigandSite（http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dligandsite/）预测配体结合位点；运用 STRING（https://string-db.org/）构建候选蛋白与相关蛋白的互作网络。

1.2.2 龙眼总 RNA 提取与 cDNA 合成

从-80℃超低温冰箱中取出龙眼的根和叶，分别将其研磨成细粉状。取 1.5 mL 离心管，将研磨好的细粉放入其中，加入 700 μLCTAB 裂解液，充分震荡混匀，65 ℃水浴 10 min，每隔 2 min 摇晃一次，冰浴 2 min。将离心管放入低温离心机，4 ℃，12 000 r/min 离心 2 min，取上清液至新的 1.5 mL 离心管中，加入 350 μL 水饱和酚和 350μL 氯仿，抽提一次，4℃，12 000 r/min 离心 2min，重复一次；加入 700 μL 氯仿提取一次，12 000 r/min 4 ℃ 离心 2 min，重复一次；取上清，加入 250 μL 无水乙醇和 250 μL 8mol/L LiCl，冰上静置 20 min，4 ℃，1 2000 r/min 离心 20 min；弃上清，75%乙醇洗涤两次，风干 5 min；加入 30 μL DEPC，得到总 RNA。根据 Vazyme 公司 HiScript® II Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 产品说明书进行逆转录，得到 cDNA，-20℃保存于冰箱备用。

1.2.3 *DlPSY* 基因差异表达分析

根据 *DlPSY* 基因序列，设计 qRT-PCR 的上游和下游引物。上游引物：ACTGTGTCCGATAAGGCAGC，下游引物：AACGGCTTTAGACAGGTGGG。依据 TransStart Top Green qPCR SuperMix 试剂盒说明书进行基因定量分析实验。反应体系(20 μL)：TransStart Top Green qPCR SuperMix10μL，ddH$_2$O 7 μL，上、下游引物各 1 μL，根和叶 cDNA 模板各 1 μL。qRT-PCR 反应条件为预变性 95℃，30s；95℃变性 30s，60℃退火 10s，延伸 30s，扩增 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法(Schmittgen & Livak，2008)计算 *PSY* 基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 DlPSY 一级结构和理化性质分析

应用 ExPASy ProtParam 分析 DlPSY 的氨基酸组成及理化性质。结果表明，DlPSY 蛋白由 420 个氨基酸组成（图 2），其中 Leu 占比最大为 10.2%，His 占比最小为 0.5%；DlPSY 蛋白质的总原子数为 6717，相对分子量为 47593.70，420 个氨基酸中有 52 个是负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)，60 个是正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)，其预测的理论等电点 PI 为 8.95，呈碱性；在波长 280 nm 下，假设所有半胱氨酸均来自胱氨酸，其 DlPSY 的消光系数为 71195M-1 cm-1，假设无半胱氨酸残基存在，其消光系数为 70820 M-1 cm -1；DlPSY 的不稳定系数为 53.51，预测该蛋白为不稳定蛋白；脂肪系数为 90.81；DlPSY 的总平均亲水性为 -0.260，预测 DlPSY 为亲水蛋白。

1 ATGTCTGTTGCATTACTTTGGGTTGTGTTACCTAACTCACAGTTGTCGAATTGCTTCGGG

```
1       M  S  V  A  L  L  W  V  V  L  P  N  S  Q  L  S  N  C  F  G
61      TTTATTGATTCGGTTAGCGATGGAAACCGGCTGATATATTCATCAAGATTGGTGAGGCGG
21      F  I  D  S  V  S  D  G  N  R  L  I  Y  S  S  R  L  V  R  R
121     AATAGGAGTTCCACGTTTGATTGTAGAGGAAAGATTAAAGATAGGAAGCAGAAACGGTAT
41      N  R  S  S  T  F  D  C  R  G  K  I  K  D  R  K  Q  K  R  Y
181     GCTTGCTCGATCAACGTCCCTGAAATATCGAGTCTGGTGGCAAGCACGGCTGATGAGCTA
61      A  C  S  I  N  V  P  E  I  S  S  L  V  A  S  T  A  D  E  L
241     GCCGTGTCTTCAGAAGAAAAGGTTTACAATGTGGTGCTGAAGCAGGCAGCTTTGATTAAG
81      A  V  S  S  E  E  K  V  Y  N  V  V  L  K  Q  A  A  L  I  K
301     GAGCAGTGGAGGTCCAGTCCGGATCTTGATGTGAATCCGGATGTTGTTTTGCCAGGAAAT
101     E  Q  W  R  S  S  P  D  L  D  V  N  P  D  V  V  L  P  G  N
361     TTGGGCTTGTTGAGTGAAGCTTATGAACGGTGTGGAGAAGTATGCGCGGAGTATGCCAAG
121     L  G  L  L  S  E  A  Y  E  R  C  G  E  V  C  A  E  Y  A  K
421     ACATTCTACTTGGGAACTCTGCTAATGACCCCGGAAAGACGAAAAGCTATATGGGCGATA
141     T  F  Y  L  G  T  L  L  M  T  P  E  R  R  K  A  I  W  A  I
481     TATGTGTGGTGTAGGAGAACAGATGAGCTTGTTGATGGACCTAATGCTTCACACATAACT
161     Y  V  W  C  R  R  T  D  E  L  V  D  G  P  N  A  S  H  I  T
541     CCAACGGCTTTAGACAGGTGGGAGTCCAGGTTGGAAGATCTTTTCCAGGGTCGTCCATAT
181     P  T  A  L  D  R  W  E  S  R  L  E  D  L  F  Q  G  R  P  Y
601     GATATGTTTGATGCTGCCTTATCGGACACAGTAGCCAAGTATCATGTCGACATTCAACCA
201     D  M  F  D  A  A  L  S  D  T  V  A  K  Y  H  V  D  I  Q  P
661     TTCAGAGATATGATTGAAGGAATGAGGATGGATCTTAGGAAGTCAAGATATAAAAACTTT
221     F  R  D  M  I  E  G  M  R  M  D  L  R  K  S  R  Y  K  N  F
721     GATGAACTATACCTCTATTGTTATAATGTGGCTGGGACAGTTGGACTAATGAGCGTTCCA
241     D  E  L  Y  L  Y  C  Y  N  V  A  G  T  V  G  L  M  S  V  P
781     GTCATGGGCATTGCCCCTGAATCAAAGGCATCCCCTGTGAGCATTTTCGATGCTGCACTG
261     V  M  G  I  A  P  E  S  K  A  S  P  V  S  I  F  D  A  A  L
841     GCATTAGGAATCGCTAATCAGCTCACCAACATACTCAGGGATGTTGGAGAAGATGCCAGA
281     A  L  G  I  A  N  Q  L  T  N  I  L  R  D  V  G  E  D  A  R
901     AGAGGAAGAGTTTATCTACCACAAGATGAGTTGGCGCGAGCGGGGCTTTCAGATGAAGAC
301     R  G  R  V  Y  L  P  Q  D  E  L  A  R  A  G  L  S  D  E  D
961     ATATTTGCTGGAAAGGTGACGGACAAATGGAAACGTTTCATGAAGAGTCAAATTAAGAGG
321     I  F  A  G  K  V  T  D  K  W  K  R  F  M  K  S  Q  I  K  R
1021    GCAAAGATGTTCTTTGACAAGGCAGAGAATGGTGTGACCGAGCTGAATGCAGCTAGTAGA
341     A  K  M  F  F  D  K  A  E  N  G  V  T  E  L  N  A  A  S  R
1081    TGGCCGGTATGGGCATCCTTGCTGCTGTATCGCCAAATATTAGATGAGATTGAAGCCAAT
361     W  P  V  W  A  S  L  L  L  Y  R  Q  I  L  D  E  I  E  A  N
1141    GATTACAACAATTTTACAAAGAGAGCATATGTGAATAAAGCCAAGAAGATAGCTGCTTTG
381     D  Y  N  N  F  T  K  R  A  Y  V  N  K  A  K  K  I  A  A  L
1201    CCGATTGCGTATACAAGGTCACTCGTACGTCCGTCCAAAAAACTTCTTCCAAGCAAGGTA
401     P  I  A  Y  T  R  S  L  V  R  P  S  K  K  L  L  P  S  K  V
1261    TAA
421     *
```

图 2 DlPSY 核酸序列及氨基酸序列

Fig.2 DlPSY nucleic acid sequence and amino acid sequence

2.2 DlPSY 蛋白的保守结构域分析

采用 NCBI CD search 分析 DlPSY 蛋白序列保守结构域，结果如图 3 所示。DlPSY 基因编码八氢番茄红素合成酶，具有 Isoprenoid Biosyn C1 超家族结构。

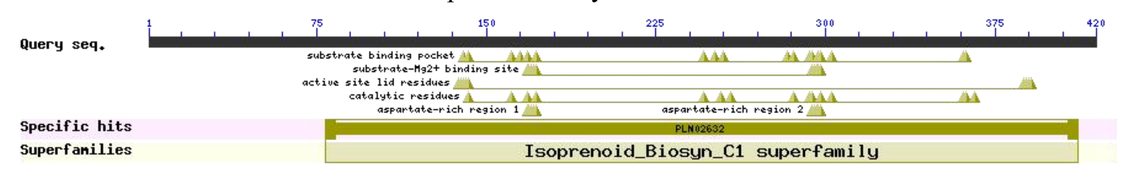


图 3　DlPSY 蛋白保守结构域分析

Fig.3　Analysis of conserved domain of DlPSY

2.3 DlPSY 蛋白的信号肽、跨膜结构域、亚细胞定位及亲疏水性分析

运用 SignalP 4.1 Server 对 DlPSY 蛋白进行信号肽预测，结果如图 4 所示。DlPSY 的最大剪切位点值(C-score)为 0.413。最大综合剪切位点值(Y-score)为 0.439，两个位点都在第 21 位氨基酸。最大信号肽值(S-score)在第 13 位氨基酸，为 0.647，大于阈值 0.5，预测 DlPSY 蛋白含有信号肽，为分泌性蛋白。

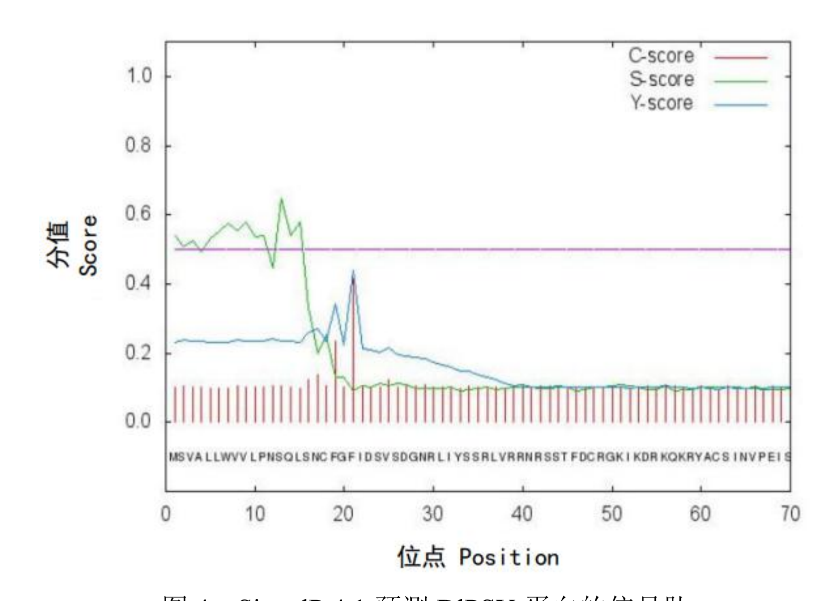


图 4　SignalP 4.1 预测 DlPSY 蛋白的信号肽

Fig.4　Prediction of signal peptide of DlPSY protein by SignalP 4.1

采用 TMHMM Server v.2.0 对 DlPSY 蛋白跨膜结构进行分析(图 5)，结果表明 DlPSY 不含有跨膜螺旋(TMHs)，无跨膜区；非跨膜螺旋区(ExpAA)概率为 0.23591，预测该蛋白为非跨膜蛋白；该蛋白质的 N 末端位于膜内侧的概率为 0.17234，总体位于膜外，整条肽链的跨膜结构预测值小于 1，推测其不存在跨膜结构域。应用 PSORT 对 DlPSY 细胞内定位进行预测，结果如表 1 所示，预测 DlPSY 蛋白可能存在于膜外。

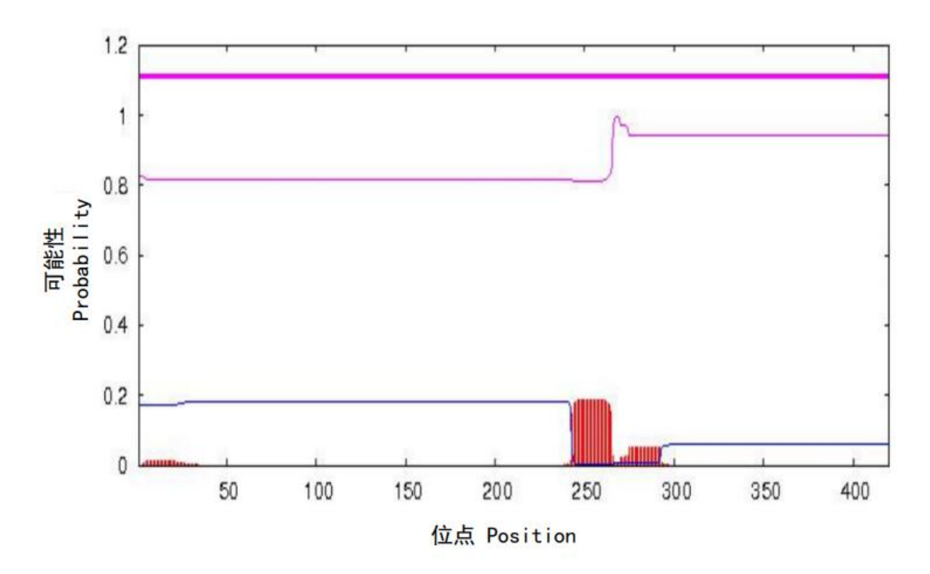


图 5　TMHMM 对 DIPSY 蛋白的跨膜性分析

Fig.5　Transmembrane analysis of DIPSY protein by TMHMM

表 1　PSORT 对 DIPSY 蛋白的亚细胞定位分析

Table 1　Analysis of subcellular location of DIPSY protein by PSORT

定位 Localization	分值 Score
膜外 Outside	0.370
细胞核 Nucleus	0.180
溶酶体 Lysosome	0.190
内质网（膜） Endoplasmic reticulum (membrane)	0.100

通过 ExPASY ProtScale 预测 DIPSY 氨基酸序列的亲疏水性(图 6)，预测结果的正分值越大，疏水性越强，负分值越小，其亲水性越强。分析结果表明，DIPSY 最大正分值(2.678)位于肽链中的第 6 位氨基酸，最小负分值(-3.022)位于第 57 位氨基酸，整条肽链的亲水性氨基酸数量大于疏水性氨基酸数量，推测 DIPSY 为可溶性亲水蛋白。

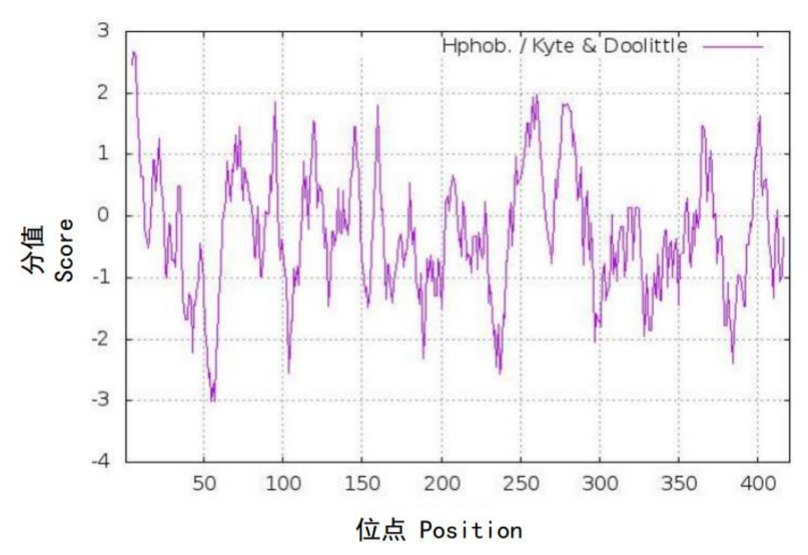
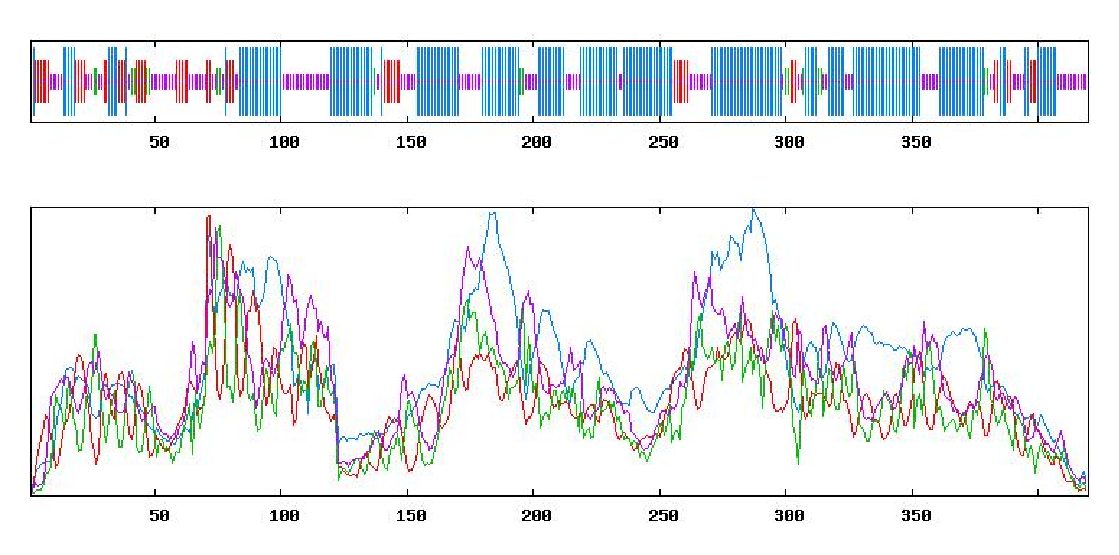


图 6 ProtScale 预测 DlPSY 蛋白的亲疏水性

Fig.6 Prediction of hydrophilicity and hydrophobicity of DlPSY protein by ProtScale

2.4 DlPSY 蛋白的二级结构分析

采用 SOPMA 对 DlPSY 蛋白二级结构进行预测，结果如图 7 所示，DlPSY 蛋白中有 235 个氨基酸残基呈现α-螺旋结构，占肽链氨基酸总数的 55.95%；49 个氨基酸残基呈延伸链结构，占肽链氨基酸总数的 11.67%；17 个氨基酸残基呈 β-转角结构，占肽链氨基酸总数的 4.05%；119 个氨基酸残基呈无规则卷曲结构，占肽链氨基酸总数的 28.33%。DlPSY 蛋白的主要结构为α-螺旋和无规则卷曲，该结构有助于蛋白质的稳定性。



注：蓝色代表α-螺旋；绿色代表β-折叠；红色代表无规则卷曲；紫色代表延伸链。

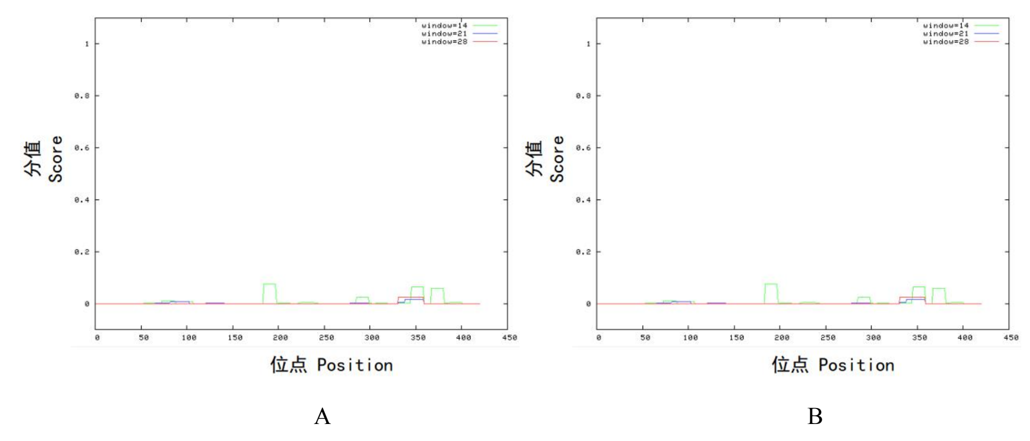
Note: Blue indicates α-helix; green indicates β-fold; red indicates irregular curl; purple indicates extended chain.

图 7 DlPSY 蛋白的二级结构分析

Fig.7 Analysis of secondary structure of DlPSY protein

2.5 DlPSY 蛋白的卷曲螺旋域分析

应用 ExPASy COILS 对 DlPSY 蛋白进行卷曲螺旋域预测(图 8)，加权与未加权的预测结果一致，推测 DlPSY 蛋白含卷曲螺旋域。



A　　B

注：**A.** 有权重；**B.** 无权重。

Note：**A.** Weight; **B.** No weight.

图 8　COILS 对 DlPSY 蛋白的卷曲螺旋分析

Fig.8　Coiled helix analysis of DlPSY by COILS

2.6 DlPSY 蛋白三级结构建模及结合位点预测

利用 SWISS-MODEL 对 DlPSY 进行蛋白质三级结构建模(PyMOL 视图) (图 9)，并利用 MolProbity Ramachandran 评估 DlPSY 的三级结构模型(图 10)。结果显示，DlPSY 蛋白 95%氨基酸位点位于最佳区域内，100%氨基酸位点位于允许区域范围，表明 DlPSY 蛋白质三级结构模型准确可靠。利用 3DLigand-Site 预测 DlPSY 蛋白质配体结合位点为 344Phe 和 347Lys（图 11）。

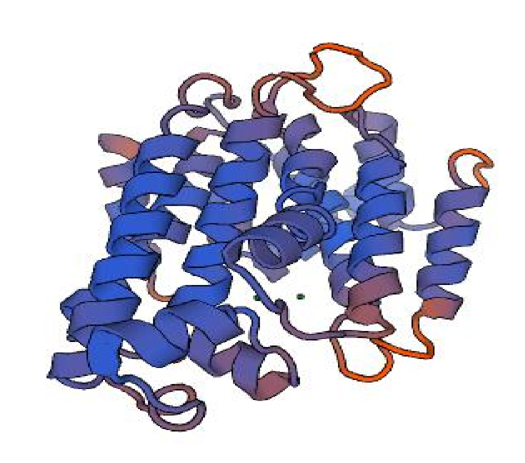


图 9　SWISS-MODEL 对 DlPSY 蛋白三级结构的预测

Fig.9　Prediction of protein tertiary structure of DlPSY by SWISS-MODEL

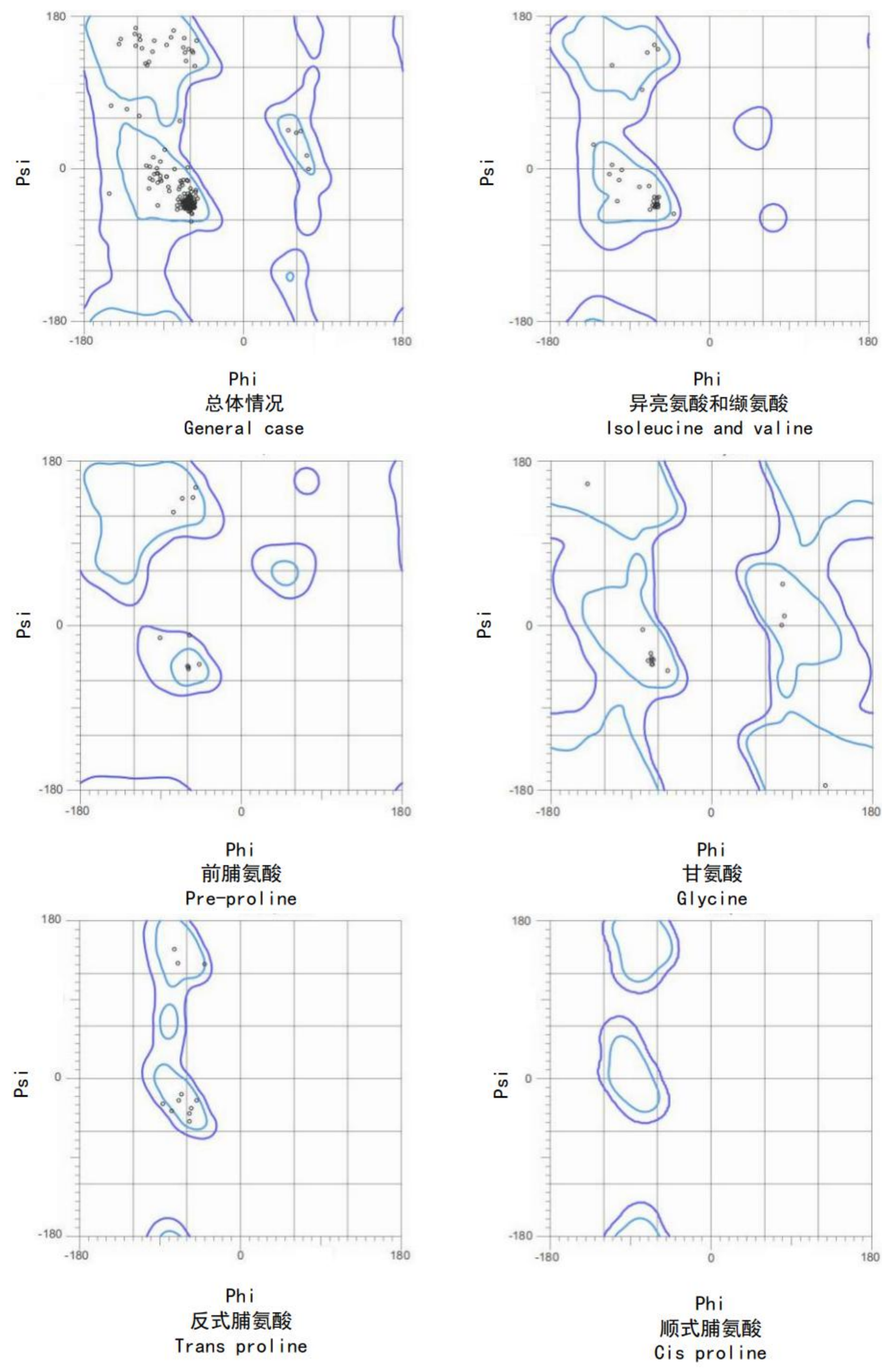
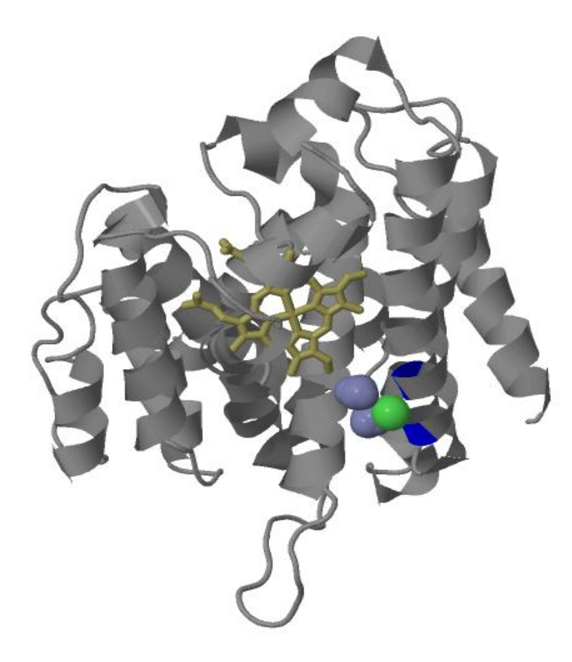


图 10　MolProbity Ramachandran 分析 DlPSY 蛋白三级结构

Fig.10　Tertiary structure analysis of DlPSY protein by MolProbity Ramachandran



注：深蓝色为结合位点。

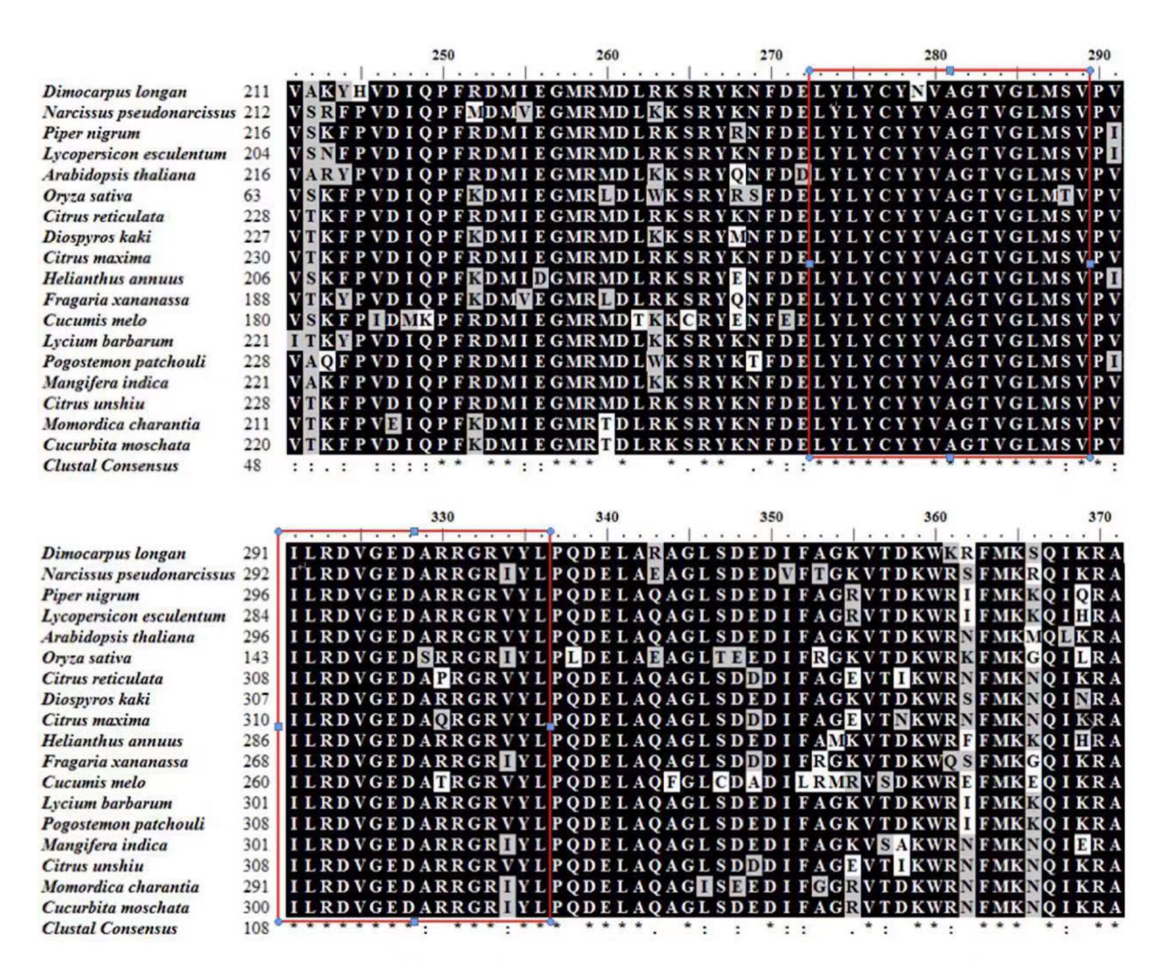
Note: Blue part is binding sites.

图 11　3DLigandSite 对 DlPSY 蛋白配体结合位点预测

Fig.11　Prediction of ligand binding sites of DlPSY by 3DligandSite

2.7 PSY 序列比对及系统进化树的构建

应用 Bioedit 对黄水仙（X78814）、胡椒（X68017）、番茄（KC767847.1）、拟南芥（L25812）、水稻（AY452768）、柑橘(AF152892)、柿子（FJ594485.1）、柚子（KP462726.1）、向日葵（CAC27383.1）、草莓（ACR61392.1）、甜瓜（AEH03199.1）、枸杞（AAW88383.1）、广藿香（AHJ90431.1）、芒果（JQ277716.1）、温州蜜柑（AF220218.1）、苦瓜（AAR86104.1）和南瓜（AEK86564.1）的 PSY 蛋白进行序列比对（图 12），采用 MEGA10 进行系统进化树的构建（图 13），探索 PSY 蛋白在不同物种之间的进化关系。结果表明，DlPSY 与柑橘、温州蜜柑、柚子、芒果的 PSY 同源性较高，推测它们来自同一个祖先，与甜瓜 PSY 的同源性较低，亲缘关系较远。

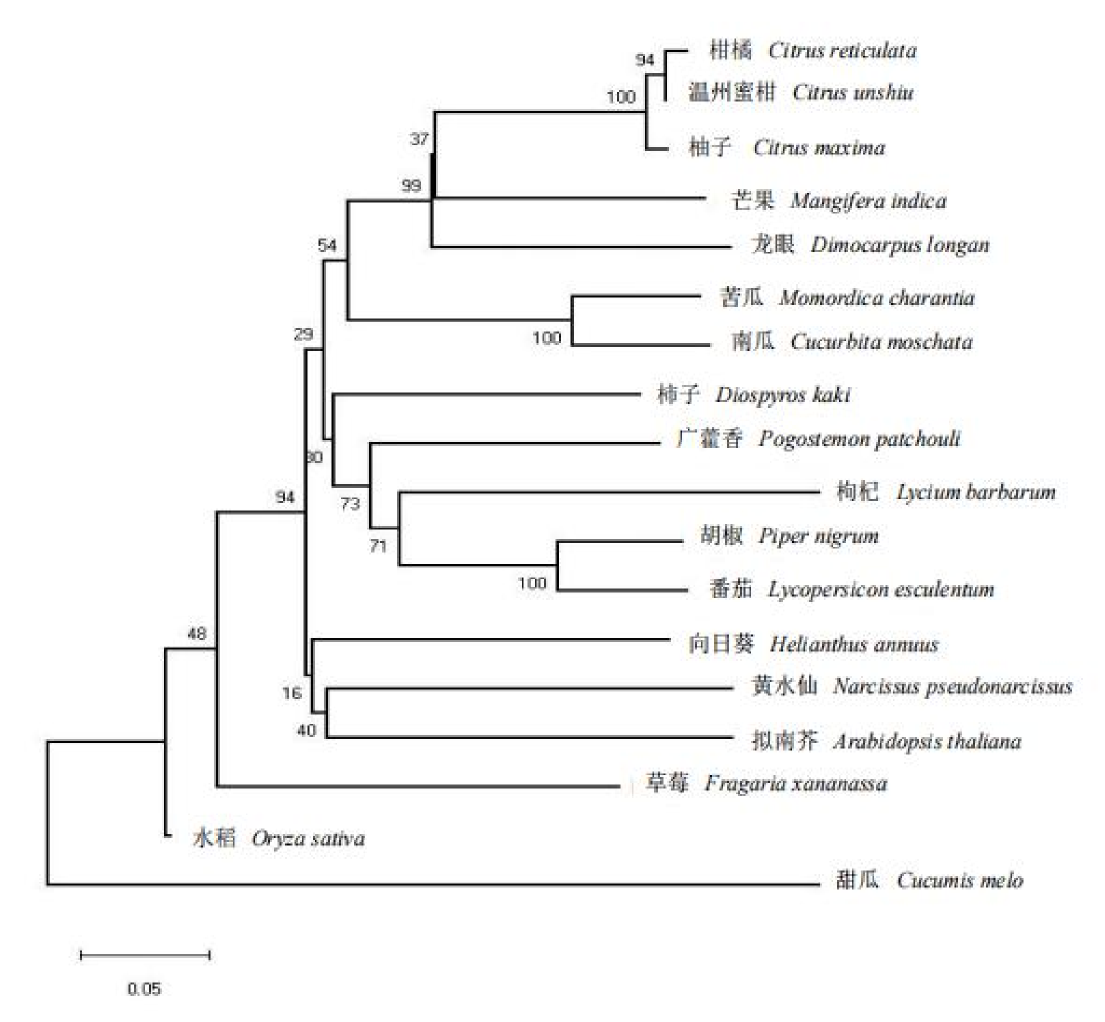


注：红框区域为 Isoprenoid Biosyn C1 高度保守区。

Note: Red frame region is a highly conserved region of Isoprenoid Biosyn C1.

图 12　18 种 PSY 高度保守区序列比对

Fig. 12　Sequence alignment of highly conserved regions of 18 PSY



注：黄水仙（X78814）；胡椒（X68017）；番茄（KC767847.1）；拟南芥（L25812）；水稻（AY452768）；柑橘(AF152892)；柿子（FJ594485.1）；柚子（KP462726.1）；向日葵（CAC27383.1）；草莓（ACR61392.1)；甜瓜（AEH03199.1）；枸杞（AAW88383.1）；广藿香（AHJ90431.1）；芒果（JQ277716.1）；温州蜜柑（AF220218.1）；苦瓜（AAR86104.1）；南瓜（AEK86564.1）。

Note: *Narcissus pseudonarcissus*(X78814); *Piper nigrum*(X68017); *Lycopersicon esculentum*(KC767847.1); *Arabidopsis thaliana*(L25812); *Oryza sativa*(AY452768); *Citrus reticulata*(AF152892); *Diospyros kaki*(FJ594485.1); *Citrus maxima*(KP462726.1); *Helianthus annuus*(CAC27383.1); *Fragaria xananassa*(ACR61392.1); *Cucumis melo*(AEH03199.1); *Lycium barbarum*(AAW88383.1); *Pogostemon patchouli*(AHJ90431.1); *Mangifera indica*(JQ277716.1); *Citrus unshiu*(AF220218.1); *Momordica charantia*(AAR86104.1); *Cucurbita moschata*(AEK86564.1).

图 13　PSY 蛋白质的系统进化树构建结果

Fig.13　Phylogenetic tree of PSYs

2.8 DlPSY 蛋白互作关系

应用 STRING 交互式数据库构建候选蛋白与相关蛋白的相互作用网络，分析预测与 DlPSY 相互作用的蛋白。选择拟南芥为模式植物，构建出的蛋白互作结果如图 14 所示，DlPSY 与 ZDS（ζ-胡萝卜素脱氢酶）、LUT2（番茄红素ε环化酶）、Z-ISO（ζ-胡萝卜素异构酶）、LYC（番茄红素β环化酶）、ABA1（玉米黄质环氧酶）、CRTISO（番茄红素异构酶）、PDS3（15-顺式八氢番茄红素去饱和酶）、GGPS1（牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶大亚基 1）、DXR（1-脱氧-D-木糖 5-磷酸还原异构酶）和 CLA1（1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶）具有

相互作用。

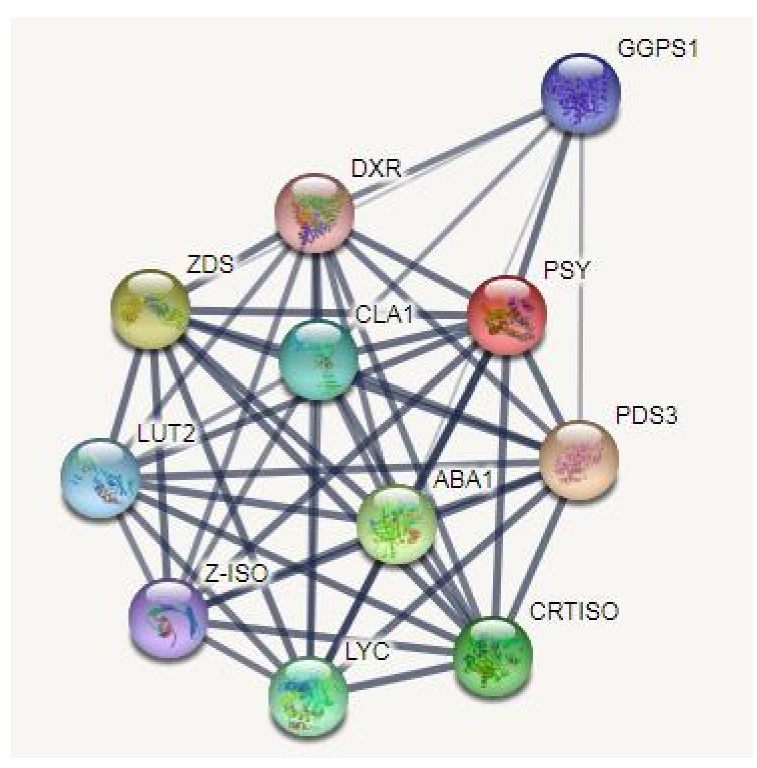


图 14　PSY 蛋白互作关系

Fig.14　Interaction of PSYs

2.9 *DlPSY* 基因在龙眼根和叶中的差异表达分析

采用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)分析从龙眼转录组数据中筛选获得的 *DlPSY* 基因在根和叶中的相对表达量，结果如图 15 所示，*DlPSY* 基因在龙眼根和叶中均有表达，叶中的表达量高于其在根中的表达量。

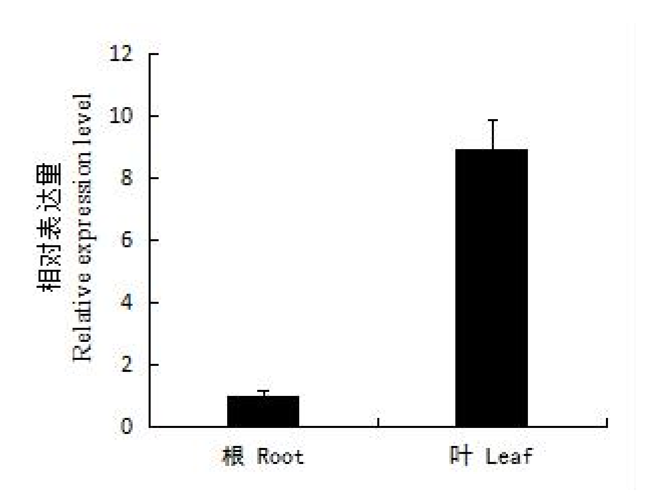


图 15　*DlPSY* 基因在龙眼根与叶中的表达量分析

Fig.15　Expression analysis of *DlPSY* in root and leaf tissues

3 结论与讨论

类胡萝卜素是植物中的一类重要的次生代谢产物，属于亲脂性类异戊二烯化合物（Walter & Strack，2011），其合成途径在很多植物中给予了详细的介绍。*PSY* 基因是类胡萝卜素合成途径中的首个合成酶基因，起到限速的作用，影响类胡萝卜素在植物组织中的积累（Zhang & Dubcovsky，2011）。在本研究中，我们根据龙眼转录组数据筛选获得一个 *DlPSY* 基因，编码 420 个氨基酸。生物信息学分析表明，该蛋白为碱性不稳定蛋白，不存在跨膜区，具有可溶和亲水的特性，存在于膜外，二级结构主要为α-螺旋和无规则卷曲，该分析结果与桃、枇杷、芒果等 PSY 蛋白一致（梁敏华等，2018；洪敏等，2018；黄建峰等，2017），推测不同植物种属间 PSY 蛋白的亲疏水性、蛋白质二级结构等具有一定的保守性。甘薯、芥蓝等 PSY 蛋白主要位于叶绿体中，直接在细胞器中发挥作用，而龙眼和芒果中的 PSY 主要位于膜外，推测其在细胞质中合成前体蛋白后，没有进入其它亚细胞器中，而是经过加工成为成熟的蛋白质后发挥作用（薛生玲等，2017；程洁等，2017）。蛋白质折叠时能够形成亲水表面和疏水内核，并且在跨膜结构中存在高疏水区域（李卿等，2015），本文对 PSY 蛋白亲疏水性分析结果表明其不存在高疏水区域，由此推断龙眼 PSY 蛋白为非跨膜亲水蛋白。

qRT-PCR 结果表明 *DlPSY* 基因在根和叶中均有表达，其叶中的表达量高于根。在已研究植物中，*PSY* 基因在不同植物中的各组织表达量存在差异，沟叶结缕草 *ZmPSY* 基因在叶中的表达量较高，草莓 *FaPSY* 基因在花中的表达量较高，而西瓜 *ClPSY* 基因在果实中的表达量较高（董笛等，2017；吕品等，2014；朱海生等，2011）。相关研究表明 *PSY* 基因的表达量与类胡萝卜素在组织中的积累呈正相关，在油菜、马铃薯和番茄中转入与类胡萝卜素合成相关的 *PSY* 基因后其类胡萝卜素含量也随之提高（罗秀芹等，2018；王玉萍等，2006），因此我们推测龙眼叶片中的类胡萝卜素的含量较根中高。

综上所述，本文从龙眼转录组数据库中筛选获得一个 *PSY* 基因，采用生物信息学的方法对其理化性质、亚细胞定位、亲疏水性和高级结构等进行研究，同时采用 qRT-PCR 技术分析 *DlPSY* 基因在龙眼根与叶中的差异表达，实验结果为后期即将开展的通过转基因方法提高类胡萝卜素的含量提供了科学依据。

参考文献：

CAMPBELL RJ, CAMPBELL CW, 2001. Longan evaluation and selection in Florida, USA[J]. Acta Hortic, (558): 125-127.

CHAIKHAM P, PRANGTHIP P, 2015. Alteration of antioxidative properties of longan flower-honey after high pressure, ultra-sonic and thermal processing[J]. Food Biosci, 10:1-7.

CHEN XH, TAN HX, ZHANG L, 2018. Research progress on biosynthetic pathway of apo-carotenoids in *Crocus sativus*[J]. Chin Trad Nerb Drugs, 49(19): 4702-4709. [陈祥慧，谭何新，张磊，2018. 西红花中类胡萝卜素生物合成途径研究进展[J]. 中草药，49(19): 4702-4709.]

CHENG J, ZHAO TF, LIAO ZH, et al., 2017. Cloning and functional verification of sweet potato phytoene synthase gene[J]. Plant Physiol J, 53(5): 865-872. [程洁，赵腾飞，廖志华，等，2017. 甘薯八氢番茄红素合成酶基因的克隆与功能验证[J]. 植物生理学报，53(5): 865-872.]

DONG D, TENG K, YU AD, et al., 2017. Cloning, subcellular localization and expression analysis of a novel phytoene synthase gene, *ZmPSY*, in *zoysia matrella*[J]. Acta Pratacul Sin, 26(11): 69-76. [董笛，滕珂，于安东，等，2017. 沟叶结缕草八氢番茄红素基因 *ZmPSY* 的克隆、亚细胞定位及表达分析[J]. 草业学报，26(11): 69-76.]

FRAY RG, WALLACE A, FRASER PD, et al., 1995. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway[J]. Plant J, 8(5): 693-701.

GRUSZECKI WI, STRZALKA K, 2005. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties[J]. Biochim Biophys Acta, 1740(2):108–115.

HONG M, CHI ZH, SHI S, et al., 2018. Analysis of cloning and expression of phytoene synthase in *Eriobotrya japonica* lindl[J]. Genom Appl Biol，37(10): 4407-4413. [洪敏，池卓恒，石丝，等, 2018. 枇杷八氢番茄红素合成酶基因的克隆及表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 37(10): 4407-4413.]

HUANG CY, LIANG J, HUANG TX, et al., 2019. α-glucosidase inhibitory activity of extracts from the leaf of *Dimocarpus longan* Lour[J]. Asia-Pacific Trad Med, 15(1): 7-9. [黄春燕，梁洁，黄团心，等, 2019. 龙眼叶提取物对α-葡萄糖苷酶抑制活性研究[J]. 亚太传统医药, 15(1): 7-9.]

HUANG JF, QIN YL, GAO AP, et al., 2017. Structural analysis and functional prediction of phytoene synthase gene *PSY* in mango[J]. SW Chin J Agric Sci, 30(3): 517-523. [黄建峰，秦于玲，高爱平，等, 2017. 芒果八氢番茄红素合成酶基因 PSY 的结构分析及功能预测[J]. 西南农业学报, 30(3): 517-523.]

HUO P, JI J, WANG G, et al., 2011. Plant carotenoid biosynthesis and function[J]. Chin iotechnol, 31(11): 107-113. [霍培，季静,王罡，等, 2011. 植物类胡萝卜素生物合成及功能[J]. 中国生物工程杂志, 31(11): 107-113.]

JIANG J, MENG FY, HE Z, et al., 2014. Sulfated modification of longan polysaccharide and its immunomodulatory and antitumor activity in vitro[J]. Int J Biol Macromol, 67: 323-329.

JIANG Y, ZHANG Z, JOYCE DC, et al.,2002. Postharvest biology and handling of longan fruit (Dimocarpus longan Lour.)[J]. Postharvest Biol Technol, 26(3): 241-252.

LI L, XU J, MU Y, et al., 2015. Chemical characterization and anti-hyperglycaemic effects of polyphenol enriched longan (*Dimocarpus longan* Lour.) pericarp extracts[J]. J Funct Foods, 13: 314-322.

LI Q, DI P, LU WQ, et al., 2015. Bioinformatics analysis of danshen kebaki pyrophosphate synthase[J]. Chin Trad Nerbal Drugs, 46（6）: 887-894. [李卿，邸鹏，陆文铨，等, 2015. 丹参柯巴基焦磷酸合酶的生物信息学分析[J]. 中草药, 46（6）: 887-894.]

LI ZH, MATTHEWS PD, BURR B, et al., 1996. Cloning and characterization of a maize cDNA encoding phytoene desaturase,an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway[J]. Plant Mol Biol, 30(2): 269-279.

LIANG MH, YANG ZF, SU XG, et al., 2018. Cloning and expression analysis of phytoene synthase gene from peach fruit[J]. Acta Agric Zhejiangen, 30(3): 399-405. [梁敏华，杨震峰，苏新国，等, 2018. 桃果实八氢番茄红素合成酶基因的克隆与表达分析[J]. 浙江农业学报, 30(3): 399-405.]

LUO XQ, YANG L, XIAO XH, et al., 2018. Analysis of carotenoids accumulation and main genes expression profile in cassava storage root[J]. J Fujian Agric For Univ (Nat Sci Ed), 47(2): 138-143. [罗秀芹，杨龙，肖鑫辉，等, 2018. 木薯块根类胡萝卜素积累与主要基因表达谱分析[J]. 福建农林大学学报：自然科学版, 47(2): 138-143.]

LV P, LI N, LIU H, et al., 2014. Cloning and expression analysis of full length lycopene synthase gene from watermelon[J]. J Zhengzhou Univ (Nat Sci Ed) 46(2): 104-108. [吕品，李娜，刘慧，等, 2014. 西瓜八氢番茄红素合成酶基因全长的克隆与表达分析[J]. 郑州大学学报(理学

版), 46(2): 104-108.]

NISAR N, LI L, LU S, et al., 2015. Carotenoid metabolism in plants[J]. Mol Plant, 8(1): 68–82.

PRASAD KN, YANG B, SHI J, et al., 2010. Enhanced antioxidant and antityrosinase activities of longan fruit pericarp by ultra-high-pressure-assisted extraction[J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 51(2): 471-477.

RANGKADILOK N, SITTHIMONCHAI S, WORASUTTAYANGKUM L, et al., 2007. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract[J]. Food And Chem Toxicol, 45(2): 328-336.

ROBERT B, HORTON P, PASCAL AA, et al., 2004. Insights into the molecular dynamics of plant light-harvesting proteins in vivo[J]. Trends Plant Sci, 9(8): 385-390.

SANAE K, CHIHIRO OY, AKEMI O., 2018. Regulation of carotenoid pigmentation in corollas of petunia[J]. Pl Mol Biol Rep, 36(4): 632-642.

SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. Nat Protoc, 3(6): 1101-1108.

SHEWMAKER CK, SHEEHY JA, DALEY M, et al., 1999. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects[J]. Plant J, 20(4): 401-412.

SUZUKI S, NISHIHARA M, NAKATSUKA T, et al., 2007. Flower color alteration in lotus japonicusby modification of the carotenoid biosynthetic pathway[J]. Plant Cell Rep, 26(7): 951-959.

THITIRATSAKU B, ANPRUNG P,2014. Prebiotic activity score and bioactive compounds in longan (*Dimocarpus longan* Lour.): influence of pectinase in enzyme-assisted extraction[J]. Food Sci Technol, 51(9): 1947-1955.

TIAN H, FANG L, ZHANG QA, et al., 2018. Transcriptome analysis of carotenoid biosynthesis in the *Brassica campestris* L. subsp. *chinensis* var. *rosularis* Tsen[J]. Sci Hort-amsterdam, 235: 116-123.

WALTER MH, STRACK D, 2011. Carotenoids and their cleavage products:biosynthesis and functions[J]. Nat Prod Rep, 28(4): 663–692.

WANG QW, 2000. The research advances of carotenoid and its clinic application[J]. Chin Pharmac Affairs, 14(1): 58-60. [王庆伟, 2000. 类胡萝卜素的研究进展与临床应用[J]. 中国药事, 14(1): 58-60.]

WANG YP, LIU QC, ZHAI H, 2006. Expression and regulation of genes related to plant carotenoid biosynthesis and their application in plant gene engineering[J]. Mol Plant Breed，4(1): 103-110. [王玉萍, 刘庆昌, 翟红, 2006. 植物类胡萝卜素生物合成相关基因的表达调控及其在植物基因工程中的应用[J]. 分子植物育种, 4(1): 103-110.]

XUE SL, ZHANG F, JIANG M, et al., 2017. Cloning and prokaryotic expression of phytoene synthase gene in *Brassica alboglabra*[J]. Genom Appl Biol, 36(2): 734-739. [薛生玲, 张芬, 江敏, 等, 2017. 芥蓝八氢番茄红素合成酶基因 *BaPSY1* 的克隆及原核表达[J]. 基因组学与应用生物学, 36(2): 734-739.]

ZHANG W, DUBCOVSKY J, 2011. Erratum to: Association between allelic variation at the phytoene synthase gene and yellow pigment content in the wheat grain[J]. Theor Appl Genet, 123(1): 193.

ZHU HS, LI YP, WEN QF, 2011. Cloning and expression analysis of phytoene synthase gene in *Fragaria ananassa* duch[J]. Sci Agric Sin, 44(2): 349-357. [朱海生, 李永平, 温庆放, 2011.

草莓八氢番茄红素合成酶基因的克隆及其表达特性[J]. 中国农业科学, 44(2): 349-357.]